

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2002年2月14日 (14.02.2002)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 02/11529 A1

- (51) 国際特許分類: A01K 67/027, C12N 15/09
 (21) 国際出願番号: PCT/JP00/05326
 (22) 国際出願日: 2000年8月9日 (09.08.2000)
 (25) 国際出願の言語: 日本語
 (26) 国際公開の言語: 日本語
 (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 財団法人
実験動物中央研究所 (CENTRAL INSTITUTE FOR
EXPERIMENTAL ANIMALS) [JP/JP]; 〒216-0001 神
奈川県川崎市宮前区野川1430番地 Kanagawa (JP).
 (72) 発明者; および
 (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 河野友宏 (KONO,
Tomohiro) [JP/JP]; 〒115-0042 東京都北区志茂2丁目16
番12号 Tokyo (JP). 小野由紀子 (ONO, Yukiko) [JP/JP];
 〒258-0021 神奈川県足柄上郡開成町吉田島3598 Kana-
gawa (JP). 下澤律浩 (SHIMOZAWA, Nobuhiro) [JP/JP];
 〒211-0041 神奈川県川崎市中原区下小田中6丁目14
番13号 ドミールカシマ103 Kanagawa (JP).
 (74) 代理人: 平木祐輔, 外 (HIRAKI, Yusuke et al.); 〒
105-0001 東京都港区虎ノ門一丁目17番1号 虎ノ門
5森ビル3階 Tokyo (JP).
 (81) 指定国 (国内): JP, KR, US.
 (84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE,
DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
 添付公開書類:
 — 国際調査報告書
 2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF CONSTRUCTING GENE MANIPULATION ANIMAL AND CLONE ANIMAL

(54) 発明の名称: 遺伝子操作動物及びクローン動物の作出方法

(57) Abstract: The cell cycle of an embryonic stem cell having been subjected to a gene manipulation is synchronized at the medium stage of the division. The nucleus of this cell is transplanted into the cytoplasm of an enucleated unfertilized ovum and the transplanted nucleus is activated, thereby constructing a gene manipulation clone animal. The animal thus constructed is useful as a model animal of various diseases.

(57) 要約:

遺伝子操作を行った胚性幹細胞の細胞周期を分裂中期に同調させ、この細胞の核を除核した未受精卵の細胞質に移植し、その移植した核に活性化させることにより、遺伝子操作クローン動物を作出する。この方法により作出された動物は各種疾患などのモデル動物として有用である。

WO 02/11529 A1

明細書

遺伝子操作動物及びクローン動物の作出方法

発明の属する技術分野

本発明は、遺伝子操作動物の作出方法及びクローン動物（遺伝的に全く同一の動物集団）の作出方法に関する。これらの方法によって作出された動物は、各種疾患などのモデル動物として有用である。

従来技術

遺伝子操作動物の作出方法としては、受精卵の核へ遺伝子を注入する方法や相同組換えを利用して胚性幹細胞（ES細胞）へ遺伝子を導入する方法などが知られているが、いずれも多大な労力と時間を要する。特に胚性幹細胞へ遺伝子を導入する場合、目的の遺伝子操作動物が直接得られるわけではなく、生殖キメラ個体を介した次世代で得られるため、その労力と時間はより多大なものとなる。また、生殖キメラを効率的に作出できる胚性幹細胞は、特定の系統に限定されているため、その系統以外の系統の遺伝子操作動物を得ようとする場合は、目的の系統への戻し交配を繰り返すことが必要となる。

ところで、これまでにウシ、ヒツジ、ヤギ、マウスで体細胞クローン動物が生産されている。これらの体細胞クローン動物の作製法においては、通常、血清飢餓培養等によりその細胞周期をG0/G1期に同調した細胞、あるいは同調培養行わずに培養された細胞が使用される。Wakayama T.らは、分裂中期（M期）に同調した細胞を使用する方法について報告しているが（Wakayama T.ら Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1999, 26, 14984-14989）、この方法で使用される分裂中期の細胞は、細胞の大きさのみを指標として選抜されたものである。また、これらの体細胞クローン動物の作製においては、核移植操作は1回だけしか行われていない。

発明が解決しようとする課題

本発明者らは、体細胞クローン動物の作製法において、ドナーとなる細胞の細胞周期を分裂中期に同調し、また、核移植操作を2回行うことにより、体細胞ク

ローンを効率的に作出できるという知見を得、先に特許出願を行った（特願平11-32772号、未公開）。しかし、この方法は、従来の方法に比べれば優れた方法であるが、新生仔が成体まで成長する過程で多数死亡してしまうという問題を有していた。

本発明の第一の目的は、従来の体細胞クローン動物の作出方法が有する問題を解決し、より効率的に体細胞クローン動物を作出する手段を提供することにある。

また、本発明の第二の目的は、上述した遺伝子操作動物の作出に関する問題を解決し、短期間で遺伝子操作動物を作出できる手段を提供することにある。

課題を解決するための手段

本発明者は、上記の課題を解決するため、鋭意検討を重ねた結果、以下の知見を得た。

- ・ 遺伝子操作を行った動物細胞の核をドナー核として体細胞クローンを作出することにより、従来の方法に比較し、短期間で遺伝子操作動物を作出できること
- ・ ドナー核として、胚性幹細胞の核を使用することにより、作出されるクローン動物の生育過程における死亡率を大幅に低減できること

以上の知見に基づき、本発明は完成されたものである。

即ち、本発明の第一は、以下の工程を含むことを特徴とする遺伝子操作動物の作出方法に関する。

- (1) 動物細胞に遺伝子操作を行う工程
- (2) 遺伝子操作を行った動物細胞の細胞周期を分裂中期に同調させる工程
- (3) 細胞周期を分裂中期に同調させた細胞の核を除核した未受精卵の細胞質に移植する工程
- (4) 移植した核に活性化処理をする工程
- (5) 移植した核由来の新生仔を得る工程

また、本発明の第二は、以下の工程を含むことを特徴とする遺伝子操作動物の作出方法に関する。

- (1) 動物細胞に遺伝子操作を行う工程
- (2) 遺伝子操作を行った動物細胞の細胞周期を分裂中期に同調させる工程

(3) 細胞周期を分裂中期に同調させた細胞の核を除核した未受精卵の細胞質に移植する工程

(4) 移植した核に活性化処理をする工程

(5) 活性化処理をした核を除核した受精卵に移植する工程

(6) 移植した核由来の新生仔を得る工程

更に、本発明の第三は、以下の工程を含むことを特徴とするクローン動物の作出方法に関する。

(1) 胚性幹細胞の細胞周期を分裂中期に同調させる工程

(2) 細胞周期を分裂中期に同調させた細胞の核を除核した未受精卵の細胞質に移植する工程

(3) 移植した核に活性化処理をする工程

(4) 移植した核由来の新生仔を得る工程

更に、本発明の第四は、以下の工程を含むことを特徴とするクローン動物の作出方法に関する。

(1) 胚性幹細胞の細胞周期を分裂中期に同調させる工程

(2) 細胞周期を分裂中期に同調させた細胞の核を除核した未受精卵の細胞質に移植する工程

(3) 移植した核に活性化処理をする工程

(4) 活性化処理をした核を除核した受精卵に移植する工程

(5) 移植した核由来の新生仔を得る

発明の開示

本発明の遺伝子操作動物の作出方法は、以下の(A)～(D)工程及び(F)工程を含み、必要に応じて(E)工程を含むことを特徴とするものである。

(A) 動物細胞に遺伝子操作を行う工程

(B) 遺伝子操作を行った動物細胞の細胞周期を分裂中期に同調させる工程

(C) 細胞周期を分裂中期に同調させた細胞の核を除核した未受精卵の細胞質に移植する工程

(D) 移植した核に活性化処理をする工程

(E) 活性化処理をした核を除核した受精卵に移植する工程

(F) 移植した核由来の新生仔を得る工程

工程 (A) では、動物細胞に遺伝子操作を行う。ここで使用する動物細胞は、どのようなものでよく、例えば、繊維芽細胞、胚性幹細胞、卵丘細胞、セルトリ細胞などを用いることができるが、好ましくは胚性幹細胞を使用する。胚性幹細胞を使用することにより、得られる個体の生育過程における死亡率を低減できる。動物細胞は、ヒト以外の動物に由来するものであれば特に限定されず、マウス、ウシ、ブタ、ヒツジ、サルなどに由来する細胞を使用することができる。遺伝子操作としては、例えば、遺伝子導入、遺伝子破壊 (ジーンターゲッティング)、遺伝子置換 (ノックイン) などを挙げることができる。

工程 (B) では、動物細胞の細胞周期を分裂中期に同調させることを行う。分裂中期への同調は、適当な試薬、例えば、ノコダゾール (Nocodazole)、コルセミド (colcemid) などにより行うことができる。

工程 (C) では、細胞周期を分裂中期に同調させた細胞の核を除核した未受精卵の細胞質に移植することを行う。未受精卵の除核は、例えば、細胞骨格重合阻害剤であるサイトカラシン B を含む操作液中で未受精卵の細胞質のやや透明の部分を引き除去して行う。核の移植は、センダイウィルス、電気刺激による細胞融合法や細胞質内注入法によって行うことができる。

工程 (D) では、核に活性化処理を行う。活性化処理としては、ストロンチウム、エタノール、電気刺激等を用いた方法を例示できる。活性化処理を行った核は分裂を開始する。

工程 (E) は、活性化処理をした核を除核した受精卵に移植することを行う。工程 (E) は、必須ではなく、工程 (D) から直ちに工程 (F) へ移行してもよい。除核及び核の移植は、工程 (C) と同様に行うことができる。受精卵は、媒精から 8~12 時間後のものを使用するのが好ましい。

工程 (F) では、移植した核由来の新生仔を得るための操作を行う。具体的には、活性化処理をした卵の培養、仮親の子宮への移植などの操作を行う。これらの操作は、常法に従って行うことができる。

本発明のクローン動物の作出方法は、以下の (B)' ~ (D) 工程及び (F) 工

程を含み、必要に応じて (E) 工程を含むことを特徴とするものである。

(B)' 胚性幹細胞の細胞周期を分裂中期に同調させる工程

(C) 細胞周期を分裂中期に同調させた細胞の核を除核した未受精卵の細胞質に移植する工程

(D) 移植した核に活性化処理をする工程

(E) 活性化処理をした核を除核した受精卵に移植する工程

(F) 移植した核由来の新生仔を得る工程

工程 (C) ~ (F) は、上記の遺伝子操作動物の作出方法と同様である。また、

(B)' も動物細胞として胚性幹細胞を必須とする点を除き、上記の遺伝子操作動物の作出方法と同様である。

実施例

遺伝子操作を行った胚性幹細胞 TT2 株をフィーダー細胞層に播種し、胚性幹細胞のコロニーを形成させた。遺伝子操作を行った TT2 株は、京大・ウイルス研、真貝洋一助教授より入手したもので、この細胞の G9a 遺伝子は、エレクトロポレーションによる相同組換えによって不活化されている（不活化した G9a 遺伝子はヘテロの状態にある）。フィーダー細胞は、CD-1 マウスの胎齢 15.5 日目の胎児をハサミ等で細切後、トリプシン処理をして得た繊維芽細胞を培養し、マイトマイシン処理したものを用いた。胚性幹細胞を十分に増殖させた後、トリプシン-EDTA で処理してフィーダー細胞と共に培養皿からはがし、別の培養皿に播種した。播種から 1 時間後に培養皿中の細胞浮遊液を採取した。胚性幹細胞とフィーダー細胞とでは培養皿へ接着するまでの時間が異なり、播種から 1 時間以内でフィーダー細胞は培養皿の底面に接着するが、胚性幹細胞は培養液中に浮遊した状態にある。従って、前記操作により採取された細胞浮遊液は胚性幹細胞だけが含まれていることになる。細胞浮遊液を遠心処理後 1 チューブあたり 1×10^5 cell/0.5ml の濃度で凍結保存液（70%DMEM、10%DMSO、20%FBS）中に浮遊させ、液体窒素中に凍結保存した。

凍結保存した胚性幹細胞を融解して、予めゼラチンでコーティングした直径 60mm の培養皿に 2×10^4 cell 播種し、3 日間 15%FBS 添加 ES 培養液中で培養した。

この培養皿は、フィーダー細胞を含まないので、これ以後の胚性幹細胞にはフィーダー細胞は混入していない。培養液の半量を除き、同量のノコダゾールを含む培養液を加え（ノコダゾールの最終濃度： $0.4\mu\text{g/ml}$ ）、分裂中期の細胞への同調処理を行った。ノコダゾール処理の時間を長くすると、細胞への傷害が認められたため、本実施例においては、処理時間を2時間とした。ノコダゾール処理後の培養液を採取し、1000rpmで5分間遠心することにより分裂中期の細胞を回収した。分裂中期の細胞は接着性が弱く培養液中に浮遊しているので、培養液を採取することにより、分裂中期の細胞を回収できる。分裂中期の細胞は丸い形態を示し、直径は間期の細胞周期にある細胞よりも約1.5倍ほど大きいので、この形態を指標として回収細胞中の分裂中期の細胞の割合を調べた。その結果、約80%の細胞が分裂中期の細胞であった。

B6CBF1 雌マウスにhCGを投与し、14時間後に第二減数分裂中期の未受精卵を採取した。この未受精卵の透明帯に、マイクロツールであるガラスナイフで1/4ほどの切れ目を作った。次にサイトカラシンB（ $5\mu\text{g/ml}$ ）を含むM2溶液中にて透明帯の切れ目よりマイクロツールであるガラスピペットを挿入し、未受精卵の細胞質のやや透明な部分を吸引除去して、その内部に染色体があることを確認することで未受精卵の除核を行った。なお、これらの顕微操作はマイクロマニピュレータを装着した倒立顕微鏡下で行い、以下の操作もこの装置で行った。このようにして除核した未受精卵をレシピエント細胞質とし、上記胚性幹細胞の核をドナー核とし、第1回目の核移植を行った。核移植操作は、サイトカラシンB（ $5\mu\text{g/ml}$ ）とノコダゾール（ $0.4\mu\text{g/ml}$ ）を含む卵子操作液（M2培地を基本培地とする溶液）中で、ホフマンモジュレーションコントラスト装置を装備した顕微鏡下で行った。このような顕微鏡を用いることにより、ピペットに注入された細胞の染色体の凝集状態を観察することができ、確実に分裂中期細胞を選別できる。ドナー核とレシピエント細胞質との融合は、不活化したセンダイウイルスを用いて行った。その融合率はおおよそ75%であった。融合完了後、1～2時間培養液中で培養し、その後10mMストロンチウムを含む培養液中で4～6時間培養して核を活性化させた。この結果、移植された核の93%が第2極体を放出し、正常な発生を開始した。このような処理を行った卵の一部を、CZB培養液の微小滴中で4日間体外

培養を行った。体外培養4日目に桑実胚あるいは胚盤胞に発生した卵子は偽妊娠3日目の仮親マウスの子宮へ移植した。

残りの卵については、第2回目の核移植に供した。第2回目の核移植は、活性化処理から8～12時間後の構築卵の核をドナー核とし、媒精から8～12時間後の除核した受精卵(F1×F1)をレシピエント細胞質として行った。除核及び核移植操作は、上記と同様に行った。また、核移植後の操作も上記と同様に行った。

各移植操作における発生状況を表1に示す。

表1

移植方法	培養胚数	移植可能胚数(%)	着床数(%)	新生仔匹数(%)	生存匹数(%)
核移植1回	548	280(51.1)	133(24.3)	20(3.7)	17(85.0)
核移植2回	269	183(68.0)	103(38.3)	7(2.6)	6(85.7)

表1に示すように、1回の核移植操作により得られた卵については、その51.1%が移植可能胚にまで発育し、最終的には3.7%(20匹)が新生仔まで発育した。2回の移植操作により得られた卵については、68.0%が移植可能胚にまで発育し、2.6%(7匹)が新生仔まで発育した。これらの新生仔のうち、それぞれ17匹および6匹が正常な成長を遂げている。

なお、胚性幹細胞の代わりに繊維芽細胞を使用して上記と同様の操作を行ったが、新生仔5匹中2匹しか正常な成長を遂げることができなかった。

発明の効果

本発明は、遺伝子操作動物及びクローン動物の新規な作出方法を提供する。

本発明の遺伝子操作動物の作出方法では、細胞培養の段階で目的の遺伝子操作細胞が選別できるため作出される個体は全て遺伝子操作個体であり、効率的に遺伝子操作動物を得ることができる。また、この方法では、胚性幹細胞を用いた従来の方法とは異なり、生殖キメラ個体を介することなく、遺伝子操作動物を直接得ることが可能であり、さらに、作出しようとする系統の培養細胞に遺伝子操作を行うことで、目的系統への戻し交雑も不要である。従って、この方法では、短期間で遺伝子操作動物を作出することができる。

また、本発明のクローン動物の作出方法では、作出されたクローン動物の生育過程における死亡率が低いので効率的にクローン動物を得ることができる。

請求の範囲

1. 以下の工程を含むことを特徴とする遺伝子操作動物の作出方法。
 - (1) 動物細胞に遺伝子操作を行う工程
 - (2) 遺伝子操作を行った動物細胞の細胞周期を分裂中期に同調させる工程
 - (3) 細胞周期を分裂中期に同調させた細胞の核を除核した未受精卵の細胞質に移植する工程
 - (4) 移植した核に活性化処理をする工程
 - (5) 移植した核由来の新生仔を得る工程
2. 以下の工程を含むことを特徴とする遺伝子操作動物の作出方法。
 - (1) 動物細胞に遺伝子操作を行う工程
 - (2) 遺伝子操作を行った動物細胞の細胞周期を分裂中期に同調させる工程
 - (3) 細胞周期を分裂中期に同調させた細胞の核を除核した未受精卵の細胞質に移植する工程
 - (4) 移植した核に活性化処理をする工程
 - (5) 活性化処理をした核を除核した受精卵に移植する工程
 - (6) 移植した核由来の新生仔を得る工程
3. 動物細胞が、胚性幹細胞であることを特徴とする請求項 1 又は 2 記載の遺伝子操作動物の作出方法。
4. 以下の工程を含むことを特徴とするクローン動物の作出方法。
 - (1) 胚性幹細胞の細胞周期を分裂中期に同調させる工程
 - (2) 細胞周期を分裂中期に同調させた細胞の核を除核した未受精卵の細胞質に移植する工程
 - (3) 移植した核に活性化処理をする工程
 - (4) 移植した核由来の新生仔を得る工程
5. 以下の工程を含むことを特徴とするクローン動物の作出方法。
 - (1) 胚性幹細胞の細胞周期を分裂中期に同調させる工程
 - (2) 細胞周期を分裂中期に同調させた細胞の核を除核した未受精卵の細胞質に移植する工程

- (3) 移植した核に活性化処理をする工程
- (4) 活性化処理をした核を除核した受精卵に移植する工程
- (5) 移植した核由来の新生仔を得る工程

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/05326

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A01K 67/027, C12N 15/09

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A01K 67/027, C12N 15/09

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS, MEDLINE, WPI

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
EY	JP 2000-228929 A (Jitsuken Doubutsu Chuo Kenkyusho), 22 August, 2000 (22.08.00) (Family: none)	1-5
X Y	W.M.Rideout et al., Nature Genetics, vol.24(2), pages 109-110 (February 2000)	1, 3, 4 2, 5
X Y	T.Wakayama et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., vol.96(26), pages 14984-14989 (1999)	4 1, 2, 3, 5
A	H.Takano et al., Theriogenology, vol.47, pages 1365-1373 (1997)	1-5
A	K.H.S.Campbell et al., Nature, vol.380(7), pages 64-66 (1996)	1-5

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not

considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing

date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is

cited to establish the publication date of another citation or other

special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other

means

"P" document published prior to the international filing date but later

than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or

priority date and not in conflict with the application but cited to

understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be

considered novel or cannot be considered to involve an inventive

step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be

considered to involve an inventive step when the document is

combined with one or more other such documents, such

combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
02 November, 2000 (02.11.00)Date of mailing of the international search report
14 November, 2000 (14.11.00)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP00/05326

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl. 7 A01K 67/027, C12N 15/09		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl. 7 A01K 67/027, C12N 15/09		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
BIOSIS, MEDLINE, WPI		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
EY	JP, 2000-228929, A (財団法人実験動物中央研究所) 22. 8月. 2000 (2. 08. 00) ファミリーなし	1-5
X Y	W. M. Rideout et al., Nature Genetics, vol. 24(2), p. 109-110 (Feb. 2000)	1, 3, 4 2, 5
X Y	T. Wakayama et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., vol. 96(26), p. 14984-14989 (1999)	4 1, 2, 3, 5
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行者若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	02. 11. 00	国際調査報告の発送日 14.11.00
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 長 井 啓 子 電話番号 03-3581-1101 内線 3236

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	H. Takano et al., Theriogenology, vol. 47, p. 1365-1373 (1997)	1-5
A	K. H. S. Campbell et al., Nature, vol. 380(7), p. 64-66 (1996)	1-5